Fluorescenzmikroskopische Untersuchung der Rhizosphäre

(Aus der Landwirtschaftlichen Forschungsanstalt Büntehof, Hannover-Kirchrode;
Dir.: Prof. Dr. E. WELTE)

Von G. TROLLDENIER

Die direkte mikroskopische Beobachtung von Mikroorganismen im Boden wurde schon von CONN (1929) und WINOGRADSKY (1925) vorgenommen. Allerdings benutzten diese zur Untersuchung Bodenaufschwemmungen, wodurch die Bodenstruktur zerstört wurde und längere Pilz- und Actinomycetenhyphen nicht beobachtet werden konnten. Eine erhebliche methodische Verbesserung gelang CHOLODNY (1930) und ROSSI (1936) durch Einführung sog. Aufwuchsplatten. Dabei werden Objektträger im Boden vergraben. Die Aufwuchsflora wird einige Zeit später nach Herausnehmen der Platten untersucht.

Aufwuchsplatten sind auch zur Untersuchung der Rhizosphärenmikroflora herangezogen worden (HULPOI, 1936; ISAKOVA, 1934; STILLE, 1938; GLATHE, BERNSTORFF und ARNOLD, 1954). Sie sind aber für die Beobachtung der Rhizosphäre nur bedingt geeignet. Nach der Entnahme der Objektträger aus dem Boden haften meist nur noch einzelne Wurzelhaare an den Platten, während die Wurzeln selbst im Boden zurückbleiben. Die von den verschiedenen Autoren veröffentlichten Abbildungen lassen denn auch stets nur Wurzelhaare mit ihrer Begleitflora erkennen.

Zur *Anfärbung* der Objektträger fand häufig *Phenolerythrosin* oder *phenolisches Bengalrosa* (STARKEY, 1938) Verwendung. Zur besseren Unterscheidung der Mikroorganismen von unbelebten Bodenpartikeln ist später von STRUGGER (1948, 1949) der Fluorescenzfarbstoff *Acridinorange* in die Bodenmikrobiologie eingeführt worden. Seine Verwendung bei der Färbung der Aufwuchsplatten erleichtert die mikroskopische Untersuchung der Bodenmikroorganismen wesentlich (LEHNER, NOWAK u. SEIBOLD, 1958; LEHNER u. NOWAK, 1959).

Auch die *Rhizosphärenpopulation* der Wurzelhaare kann an Aufwuchsplatten, die mit Acridinorange gefärbt sind, besser studiert werden. Die direkte Beobachtung des Mikroorganismenbewuchses auf der Wurzeloberfläche ist durch *Auflichtmikroskopie* möglich. LINFORD (1940, 1942) verwendete kleine Wachstumskammern mit Glasfenstern, durch die im Auflicht die Wurzeln betrachtet werden können. Auf diese Weise, sowie an gefärbten Wurzelstücken konnte er an der Wurzeloberfläche Bakterien, Actinomyceten, Pilze, Protozoen und Nematoden beobachten.

Eine fluorescenzmikroskopische Untersuchung der Bodenmikroflora an Bodenpartikeln im Auflicht wurde von KRASILNIKOV und ZVYAGINTSEV (1958) vorgenommen. Diese Methode wurde von ZVYAGINTSEV (1962) auf die Untersuchung der Rhizosphäre ausgedehnt. Leider sind die Bilder, die bei der Auflichtmikroskopie, insbesondere mit Fluorescenzlicht, erhalten werden, wegen der Unschärfe durch die räumliche Verteilung der Objekte und wegen der Lichtschwäche der Auflichtfluorescenz wenig befriedigend. Aus diesem Grunde wurden die nachstehend mitgeteilten Untersuchungen im *Durchlicht* vorgenommen.

Methodik

Ein Teil der Untersuchungen umfaßt die *Durchmusterung* von Aufwuchsplatten. Zu diesem Zweck wurden Objektträger in Blumentöpfe derart eingesetzt, daß die Wurzeln des eingesäten *Rotklees* und *Weizens* an ihnen entlang wuchsen. Die Objektträger wurden nach etwa 3 Wochen dem Boden entnommen, mit Acridinorange (MERCK) 1:15 000 angefärbt und fluorescenzmikroskopisch untersucht. Auf diese Weise war eine Beobachtung der frei im Boden und an den Wurzelhaaren auftretenden Mikroorganismen möglich.

Zu ihrer Beobachtung auf der Wurzeloberfläche wurden auf mineralischem Schrägagar kultivierte und mit Bodenfiltrat beimpfte Rotklee- und Weizenpflänzchen verwendet. Die Färbung der auf der Agaroberfläche entlanggewachsenen Wurzeln erfolgte durch Zugabe einer Lösung von Acridinorange in Leitungswasser 1:15 000. Destilliertes Wasser war wegen seiner dispergierenden Wirkung und der damit bestehenden Möglichkeit, daß

Bakterien von den Wurzeln abgelöst werden, vermieden worden. Die so gefärbten Wurzelstücke wurden anschließend auf Deckgläser gelegt, auf dem Tisch eines Gefriermikrotoms gefroren und dann so weit mit einer Rasierklinge abgeschnitten, daß nur noch ein Teil der Epidermis mit Wurzelhaaren auf dem Deckglas zurückblieb. Mit gleicher Methodik ist es möglich, dem Boden entnommene, von Quarzkörnern und anderen Bodenpartikeln weitgehend befreite Wurzelstücke fluorescenzmikroskopisch zu untersuchen.

Die Mikroskopie wurde mit einem Zeiss-Standard-Mikroskop mit Fluorescenzeinrichtung, Erregerfilter BG 12 (SCHOTT) und Sperrfilter OG 4 (Sperrfilter für Blau) und OG 5 (Sperrfilter für Blau) oder GG 4 (Sperrfilter für UV) vorgenommen. (Weitere Einzelheiten zur mikrophotographischen Methodik s. TROLLDENIER, 1965).

Ergebnisse

1. *Untersuchung der Rhizosphäre mit Hilfe von Aufwuchsplatten*

An Aufwuchsplatten haftende Wurzelhaare zeigen eine vielfältigere Artenzusammensetzung der Mikroorganismen als Wurzeln von Pflanzen, die auf mineralischem Schrägagar gezogen wurden. Neben Bakterien sind auch Actinomyceten, die an der Oberfläche der Wurzelhaare entlang wachsen, zu beobachten.

Ein Beispiel für die Besiedlung von *Rotklee-Wurzelhaaren* gibt Abbildung 1 (Vergr. 400fach). Es sind zwei Wurzelhaare erkennbar, auf denen sich Bakterien mit verschiedenen Kolonieformen angesiedelt haben. Am auffälligsten ist eine große Kolonie mit kokkenartigen Einzelindividuen. Bakterien und Actinomyceten an Wurzelhaaren von *Weizen* sind in Abbildung 2 und 3 zu sehen. Actinomycetenmycel umspinnt die Wurzelhaare, während Mikrokolonien von Bakterien der Wurzeloberfläche entweder direkt aufsitzen oder sich in ihrer Nähe angesiedelt haben. Eine *Stäbchenkette* ist in Abbildung 3 auf einem Wurzelhaar zu erkennen.

2. *Untersuchung der Rhizosphäre an Wurzeldünnschnitten*

Nach der beschriebenen Methode wurden *Wurzeldünnschnitte* hergestellt. In diesen Präparaten sind die Mikroorganismen besser zu beobachten als bei der früher benutzten Mazeration der Wurzeln mit Präpariernadeln bzw. an Quetschpräparaten von Wurzeln. Mit solchen Maßnahmen wird die geringe Schichtdecke der Präparate, die für fluorescenzmikroskopische Aufnahmen erforderlich ist, nur unvollkommen erreicht. Die Mikroorganismen haften sehr stark an der Wurzeloberfläche. Durch die Färbemaßnahme und Einbettung in Wasser werden sie kaum abgelöst. Nur wenige Bakterien schwimmen zwischen den Wurzelhaaren, ein Zeichen dafür, daß es sich um eine echte Aufwuchsflora an der Wurzeloberfläche — *Rhizoplane* nach CLARK (1949) — handelt. Abbildung 4 zeigt Wurzelhaare von *Rotklee*, die mit zahlreichen grün fluorescierenden Bakterien dicht besetzt sind (Vergr. 400fach). Der außerordentlich dichte Bewuchs mit Bakterien, die wie ein Rasen die Wurzeloberfläche bedecken, ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Unter den Kulturbedingungen dominierten Kurzstäbchen in der reich besiedelten Rhizosphäre des Rotklees. Aber auch bei *Sommerweizen* konnte die Entwicklung einer dichten Rhizosphärenmikroflora beobachtet werden. Die Bakterien unterschieden sich morphologisch von denen, die an Rotkleewurzeln anzutreffen waren. In Abbildung 6 sind Kurz- und Langstäbchen, die rot und grün fluorescieren, auf der Wurzelepidermis zu sehen (Vergr. 400fach).

Diskussion

Mit Hilfe von Aufwuchsplatten ist es möglich, einen räumlichen Eindruck von der Ausdehnung der Rhizosphäre um die Wurzelhaare zu bekommen, während nach der Herstellung von Längsschnitten durch die Wurzel nur die der Wurzelepidermis

unmittelbar fest aufsitzenden Organismen erfaßt werden. Wie Aufwuchsplatten und Keimzahlbestimmungen von gewaschenen, weitgehend von der Erde befreiten Wurzeln zeigen, ist die Rhizosphärenbesiedlung an der *Wurzeloberfläche* am größten. Eigene Untersuchungen lassen ebenfalls erkennen, daß Bakterien außerordentlich stark an der Wurzeloberfläche haften. Für diese Zone wurde von CLARK (1949) der Ausdruck Rhizoplane geprägt; frühere Untersucher bezeichneten sie als innere Rhizosphäre, an die sich die äußere Rhizosphäre anschließt (GRÄV, 1930).

Schon an keimenden Samen ist eine beachtliche Entwicklung von Mikroorganismen beobachtet worden (MÜLLER, 1962), die zum Teil von am Samen haftenden Mikroorganismen stammen (ROVIRA, 1956). Es wurde vielfach nachgewiesen, daß der Rhizosphärenmikroflora eine gewisse Pflanzenspezifität zukommt (KAUNAT, 1963), die sich, wie die abgebildeten Fluorescenzaufnahmen zeigen, schon in morphologisch unterschiedlichen Formen darbietet. Unter den Anzuchtbedingungen fanden sich an *Rotkleewurzeln* nur Kurzstäbchen, an *Weizenwurzeln* Kurz- und Langstäbchen.

Zusammenfassung

Die Rhizosphäre von Rotklee und Weizen wurde fluorescenzmikroskopisch unter Anfärbung mit Acridinorange untersucht. An Aufwuchsplatten wurde die Besiedlung der Umgebung von Wurzelhaaren beobachtet. Herstellung dünner Längsschnitte durch die Wurzeln machte eine gute Beobachtbarkeit des Bewuchses der Wurzelepidermis im Fluorescenzlicht möglich. Wurzelhaare und Wurzeloberfläche der untersuchten Pflanzen waren von einem dichten Mantel von Mikroorganismen umgeben, wie die beigefügten Abbildungen veranschaulichen.

Summary

The rhizosphere of red clover and wheat was studied by staining with acridinorange in fluorescent light. The population of the environment of root hairs was observed on contact slides. In fluorescent light, an excellent observation of the overgrowth of the root epidermis was possible by the preparation of thin longitudinal sections through the roots. Root hairs and root surface of the examined plants were surrounded by a dense coat of microorganisms, as the coloured plates demonstrate.

Schrifttum

CLARK, F. E.: Soil microorganisms and plant roots. Advanc. Agron. **1**, 241—288, 1949.

CONN, H. J.: Use of the microscope in studying the activities of bacteria in soil. J. Bacteriol., Baltimore **17**, 399—405, 1929.

Legende zu den nebenstehenden Farbbildern

Abb. 1: *Wurzelhaare von Rotklee an einer Aufwuchsplatte besiedelt von Bakterien.*

Abb. 2: *Wurzelhaar von Weizen besiedelt von Bakterien und Actinomyceten.*

Abb. 3: *Wurzelhaare von Weizen mit Bakterien und Actinomyceten.*

Abb. 4: *Wurzelhaare von Rotklee bedeckt mit Bakterien.*

Abb. 5: *Wurzelepidermis von Rotklee dicht besiedelt mit Bakterien.*

Abb. 6: *Wurzelepidermis von Weizen mit Bakterienbewuchs.*

Alle Vergr. etwa 400-fach.

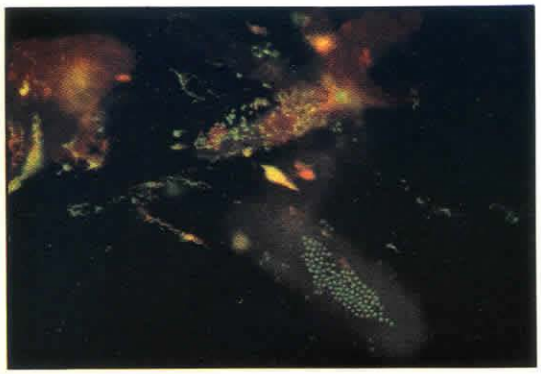

Abb. 1

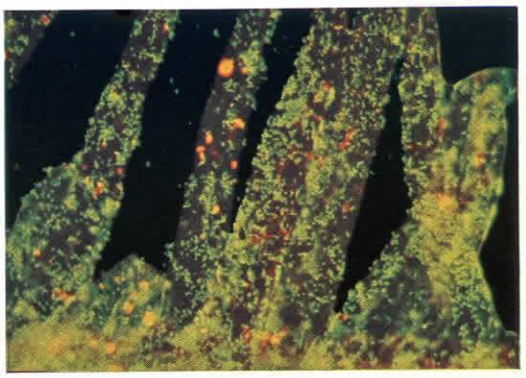

Abb. 4

Abb. 2

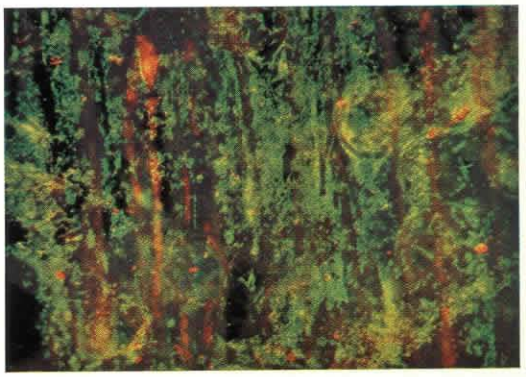

Abb. 5

Abb. 3

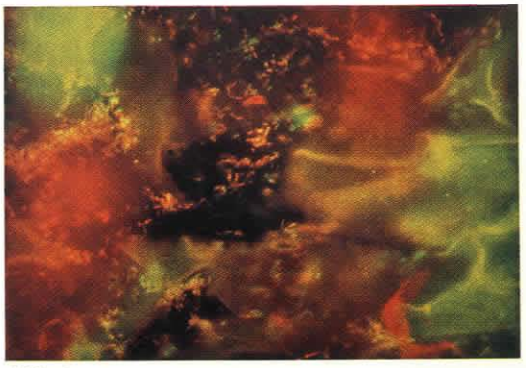

Abb. 6

CHOLODNY, N.: Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. Arch. Mikrobiol. **1**, 620—652, 1930.
GLATHE, H., v. BERNSTORFF, C. u. ARNOLD, A.: Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen und höheren Pflanzen im Bereich der Rhizosphäre. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infekt.-Krankh. Hyg. Abt. II, 107, 481—488, 1954.
GRÄV, G.: Über den Einfluß des Pflanzenwachstums auf die Bakterien im Wurzelbereich. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infekt.-Krankh. Hyg. Abt. II, 44—69, 1930/31.
HULPOI, N.: Demonstration von Mikroorganismen der Rhizosphäre vermittels der Aufwuchsplattenmethode nach Cholodny. Arch. Mikrobiol. **7**, 579—583, 1936.
ISAKOVA, A.: On the interrelations of higher plants and microorganisms. Bull. Acad. Sci. UdSSR, Ch. Sci. nat. et math., **7**, 993—1006, 1934. (Russ. m. dtsch. Zusfassg.), ref. in Bot. Zbl. N. F. **28** (170), 271, 1936/37.
KAUNAT, H.: Zum Problem der Spezifität der Rhizosphärenmikroflora von Kulturpflanzen. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infekt.-Krankh. Hyg. Abt. II, 116; 694—709, 1963.
KRASILNIKOV, N. A., u. ZVYAGINTSEV, D. G.: The use of fluorescence microscopy in reflected light for the study of the soil microflora. Nauk 123, 366—367, 1958, ref. i. Soils a. Fertil., England **22**, 114, 1959.
LEHNER, A., NOWAK, W., u. SEIBOLD, L.: Eine Weiterentwicklung des Boden-Fluorochromierungsverfahrens mit Acridinorgange zur Kombinationsmethode. Landwirtsch. Forsch. **11**, 121—127, 1958.
LEHNER, A. u. NOWAK, W.: Neuere Ergebnisse des Direktnachweises von Bakterien im Boden mittels der kombinierten Aufwuchs-Fluorochromierungsmethode. Zbl. Bakteriol., Parasitenkde., Infekt.-Krankh. Hyg. Abt. II, 113; 32—34, 1959.
LINFORD, M. B.: Methods of observing soil flora and fauna associated with roots. Soil. Sci., Baltimore 53, 93—103, 1942.
MÜLLER, H.: Untersuchungen zur Frage wechselseitiger Beziehungen zwischen keimenden Samen und Mikroorganismen in Samennähe. Arch. Mikrobiol. **41**, 351—382, 1962.
ROVIRA, A. D.: A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. J. appl. Bacteriol. **19**, 72—79, 1956.
ROSSI, G.: Direct microscopic and bacteriological examination of the soil. Soil Sci., Baltimore **41**, 53—66, 1936.
STARKEY, R. L.: Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. VI. Microscopic examination of the rhizosphere. Soil Sci., Baltimore **45**, 207—249, 1938.
STILLE, B.: Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. Arch. Mikrobiol. **9**, 477—485, 1938.
STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Schaper-Verlag, Hannover 1949.
STRUGGER, S.: Fluorescence microscopic examinations of bacteria in soil. Canad. J. Res. **C 26**, 188—193, 1948.
TROLLDENIER, G.: Fluoreszenzmikroskopie in der Rhizosphärenforschung. Zeiss-Informationen April 1965.
WINOGRADSKY, S.: Etudes sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode. Ann. Inst. Pasteur **39**, 299—354, 1925.
ZVYAGINTSEV, D. V.: Rhizosphere microflora as studied by fluorescent microscopy in reflected light. Microbiology (Moskau, Transl.) **31**, 88—91, 1962.